# RIDASCREEN® Calprotectin

Art. Nº: G09036

R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt,
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20

## 1. Área de aplicação

Para diagnóstico *in vitro*. O teste RIDASCREEN® Calprotectin é um teste imunoenzimático para determinação quantitativa de calprotectina fecal humana.

## 2. Resumo e explicação do teste

Calprotectina é uma proteína ligadora de cálcio formada em granulócitos neutrófilos entre outros e liberada quando de inflamações.
A calprotectina fecal serve de biomarcador para processos inflamatórios e alterações neoplasmáticas no trato gastrointestinal.

Calprotectina (também conhecida como MRP-8/14, calgranulina A/B ou S100A8/A9) é uma proteína ligadora de cálcio e zinco da família de proteínas S100.
Sob condições fisiológicas, a calprotectina liga cálcio; esta ligação de cálcio exige alta estabilidade face a calor e proteólise.
A calprotectina é formada tanto por granulócitos neutrófilos como por monócitos. No citossol de neutrófilos, a calprotectina existe em concentrações de 5-15 mg/l e representa cerca de 60% das proteínas citossólicas solúveis ou 5% do total de proteínas.
A função biológica da calprotectina ainda não está esclarecida completamente. Supõe-se que a calprotectina exerce uma função protetora da célula contra proteases leucocitárias e bacterianas. Além disso, supõe-se um efeito antibacteriano devido à propriedade de ligação de zinco. Também em processos inflamatórios, a calprotectina demonstra propriedades reguladoras intra-celulares e extra-celulares.

No caso de uma doença inflamátoria do intestino, os granulócitos migram para o lúmen do intestino onde liberam calprotectina que por sua vez é excretada com as fezes. A concentração de calprotectina nas fezes corresponde à quantidade dos granulócitos neutrófilos que migram para o lúmen do intestino e que ali a liberam. Consequentemente, a concentração da calprotectina nas fezes pode ser tomada para medição da quantidade dos granulócitos no lúmen do intestino e mostra a severidade de um processo inflamatório do intestino.

A relevância clínica especial da determinação da calprotectina fecal é o fato de poder-se diagnosticar fiavelmente doenças inflamatórias no intestino. Em termos de sintomas, os pacientes com doença inflamatória intestinal crônica (DII) muitas vezes dificilmente podem ser distinguidos dos pacientes que sofrem da síndrome do colón irritável (SCI). A determinação da calprotectina fecal fornece uma indicação segura da existência de uma doença inflamatória no intestino. Consequentemente, a utilização deste biomarcador permite evitar colonoscopias não-necessárias em pacientes que sofrem da síndrome do colón irritável.

Numerosas publicações demonstraram que a concentração de calprotectina fecal correlaciona perfeitamente os parâmetros histológicos e endoscópicos de atividade da doença em pacientes com doença inflamatória intestinal crônica (DII). Por isso, a determinação da calprotectina fecal também serve para documentar objetivamente o sucesso terapêutico de pacientes com inflamações crônicas e para detectar e tratar precocemente recidiva em pacientes sob vigilância nos intervalos sem sintomas.

A determinação de calprotectina fecal deve ser ponderada para

- diferenciação fiável entre doença inflamatória intestinal crônica e síndrome do colón irritável
- detecção precoce da recorrência de inflamações no intestino
- documentação objetiva da severidade de uma inflamação para controle da evolução e terapia
- marcador para inflamações agudas do intestino

## 3. Princípio do teste

No teste RIDASCREEN® Calprotectin são aplicados anticorpos específicos em um método sanduíche. A superfície do poço da microplaca está revestida com anticorpos monoclonais contra calprotectina humana. Uma suspensão da amostra fecal a analisar é pipetada no poço da microplaca e incubada. Depois disso, segue-se uma lavagem e uma segunda incubação com um anticorpo monoclonal que está conjugado com peroxidase de raiz-forte. Existindo calprotectina na amostra, forma-se um complexo tipo sanduíche constituído pelo anticorpo imobilizado, pela calprotectina e pelo anticorpo conjugado. Os anticorpos marcados com enzimas não-ligados são removidos em uma lavagem seguinte. Depois da adição de substrato, a enzima ligada em amostras positivas transforma a solução incolor nos poços da microplaca em uma solução azul. Mediante adição do reagente de parada, esta cor muda de azul para amarelo. A extinção medida é proporcional à concentração de calprotectina existente na amostra.

## 4. Conteúdo da embalagem

Os reagentes de uma embagalem são suficientes para 96 testes

| | | |
|---|---|---|
| Plate | 96 testes | Microplaca; 12 tiras (divisíveis) no suporte; revestida com anticorpos monoclonais (rato) contra calprotectina humana |
| Extract | 2x 100 ml | Tampão de extração (3x conc.); tampão Tris; contém 0,05% $NaN_3$ |
| Diluent \| 3 | 100 ml | Tampão de diluição de amostras; solução de NaCl tamponada com proteína; contém 0,1% $NaN_3$; pronto para uso; coloração vermelha |
| Wash | 100 ml | Tampão de lavagem (10x conc.); solução NaCl tamponada com fosfato; contém 0,1% Thimerosal, 0,1% detergente |
| Calibrator<br>*tampa transparente* | 1 ml | Calibrador (para o procedimento de calibração de 1 ponto); contém 0,1% $NaN_3$; pronto para uso; |
| Standard 1 a Standard 5<br>*tampa branca* | 1 ml | 5 padrões (para o procedimento de curva padrão); concentrações de calprotectina dos padrões 1 a 5: 19,5 / 56 / 95 / 275 / 800 mg/kg; contém 0,1% $NaN_3$; pronto para uso |
| Control \| +<br>*tampa vermelha* | 1 ml | Controle positivo; contém 0,1% $NaN_3$; pronto para uso |
| Low control \| +<br>*tampa verde* | 1 ml | Controle "Low-Positiv"; contém 0,1% $NaN_3$; pronto para uso |
| Conjugate | 12 ml | Anticorpo monoclonal (rato) conjugado com peroxidase em solução proteica estabilizada; pronto para uso |
| SeroSC | 12 ml | Substrato; peróxido de hidrogênio / tetrametilbenzidina (TMB); pronto para uso |
| Stop | 12 ml | Reagente de parada; 1 N ácido sulfúrico; pronto para uso |

## 5. Reagentes e seu armazenamento

Os reagentes devem ser armazenados entre 2 - 8 °C e podem ser utilizados até a expiração da data de validade impressa na respectiva etiqueta. O tampão de lavagem diluído pode ser utilizado 4 semanas quando armazenado entre 2 - 8 °C. O tampão de extração diluído pode ser utilizado 6 meses quando armazenado entre 2 – 8 °C e no máximo até o fim do prazo de validade do concentrado. Evitar a contaminação com micróbios! Após expiração da data de validade a qualidade não é garantida. Abrir a embalagem de alumínimo das tiras de microtitulação com uma tesoura de modo a não cortar o fecho. As tiras de microtitulação que não são necessárias devem voltar a ser guardadas imediatamente na embalagem de alumínio entre 2 - 8 °C. Evitar a incidência de luz direta sobre o substrato incolor para prevenir a degradação ou o azulamento devido a auto-oxidação. Quando o substrato apresentar uma cor azulada, já não deve ser utilizado.

## 6. Reagentes adicionais necessários e equipamento acessório

6.1. Reagentes

- Água destilada ou desionizada

6.2. Equipamento acessório

- Balança de precisão ou tubo para fezes RIDASCREEN® Stuhlröhrchen (art. nº. GZ3006)
- Mixer Vortex (opcional, ver 9.4.)
- Micropipeta para volumes de 20 - 100 µl e 1 ml
- Proveta (1000 ml)
- Cronômetro
- Lavadora para microplacas ou pipetas multicanais (300 µl)
- Fotômetro para microplacas (450 nm; filtro de referência 620 nm)
- Papel filtro (panos de laboratório)
- Recipiente para lixo com uma solução de 0,5 % de hipoclorito

## 7. Medidas de precaução

Somente para diagnóstico *in vitro*.

Este teste deve ser realizado somente por pessoal de laboratório devidamente instruído. As regras de trabalho nos laboratórios devem ser respeitadas. As instruções de uso devem ser seguidas estritamente durante a realização do teste.

As amostras fecais devem ser tratadas como potencialmente infecciosas nos termos dos regulamentos de segurança nacionais.

Não pipetar as amostras nem os reagentes com a boca e evitar o contato com lesões na pele ou nas mucosas. Usar luvas descartáveis durante o manuseamento das amostras e lavar as

mãos no fim do teste. Não fumar, comer nem beber nas áreas onde se trabalha com as amostras ou com os reagentes do teste.

O tampão de lavagem contém 0,1 % de Thimerosal como conservante. O contato com a pele ou com as mucosas deve ser evitado.

O calibrador, os padrões, o controle positivo, o controle "Low-Positiv" e o tampão de extração e diluição de amostras contêm 0,05% ou 0,1% $NaN_3$ como conservante. O contato com a pele ou com as mucosas deve ser evitado.

Peróxido de hidrogênio (substrato) pode causar corrosão. Manuseá-lo com cuidado!

O reagente de parada contém 1 N ácido sulfúrico. Evitar o contato com a pele e com o vestuário! No caso de contato com a pele, lavá-la com água.

Todos os reagentes e materiais que entrarem em contato com amostras potencialmente infecciosas, têm de ser tratados com desifetantes adequados ou então autoclavados a 121 °C durante pelo menos uma hora. CUIDADO: para evitar a formação de gases venenosos, o dejeto líquido que incluir reagente de parada tem de ser neutralizado antes de ser colocado em uma solução de hipoclorito.

## 8. Coleta e armazenamento das amostras

As amostras fecais devem ser transportadas refrigeradas sempre que possível e guardadas entre 2 - 8 °C até o começo do teste. Se elas não forem processadas logo a seguir ao ingresso (dentro de 3 dias), recomendamos guardá-las a -20 °C ou mais. Ao congelar a amostra fecal, os granulócitos neutrófilos nela existentes podem rebentar e liberar calprotectina. Por isso, em comparação com amostras frescas a concentração em amostras congeladas pode ser ligeiramente maior. O congelamento e descongelamento repetidos da amostra devem ser evitados. Amostras fecais não devem ser guardadas em recipientes de transporte que contenham fluidos de transporte com conservantes, soros animais, íons de metal nem agentes ou detergentes oxidantes uma vez que estas substâncias podem interferir no teste RIDASCREEN® Calprotectin.

## 9. Realização do teste

### 9.1. Generalidades

Antes de serem utilizados, todos os reagentes e a microplaca Plate têm de estar necessariamente a temperatura ambiente (20 - 25 °C). As tiras de microtitulação não devem ser retiradas da embalagem de alumínio antes de atingirem a temperatura ambiente. Os reagentes devem ser bem misturados pouco antes de serem utilizados. As tiras de microtitulação que não são necessárias devem ser guardadas novamente (na embalagem fechada) com os reagentes entre 2 - 8 °C. As tiras de microtitulação usadas uma vez não devem voltar a ser utilizadas. Os reagentes e as tiras de microtitulação não devem ser

utilizados quando a embalagem estiver danificada ou os frascos apresentarem derrames. Evitar o contato direto das amostras com os componentes do kit para excluir a contaminação cruzada. Evitar a incidência de luz solar direta durante a realização do teste. Recomendamos cobrir a microplaca ou vedá-la com fita adesiva para evitar perdas por evaporação.

9.2. Preparação do tampão de lavagem

1 parte do tampão de lavagem Wash é misturada com 9 partes de água destilada (1:10). Para isso, verte-se 100 ml de concentrado em uma proveta de 1000 ml e adiciona-se água destilada até se atingir os 1000 ml. Os cristais eventualmente existentes no concentrado devem ser dissolvidos previamente mediante aquecimento (em banho-maria a 37 °C).

9.3. Preparação do tampão de extração

1 parte do tampão de extração Extract (100 ml) é misturada com 2 partes de água destilada (200 ml) (1:3).

9.4. Preparação das amostras

As amostras fecais devem ser guardadas permanentemente entre 2 - 8 °C até serem processadas. Se for necesário guardá-las mais tempo (> 3 dias), elas devem ser guardadas a -20°C ou temperatura ainda mais baixa. Amostras congeladas devem atingir lentamente a temperatura ambiente.

9.4.1. Preparação e suspensão das amostras mediante pesagem

Pesar 100 mg de amostra fecal em um tubo de teste devidamente marcado e em seguida adicionar-lhe com a pipeta 5 ml de tampão de extração diluído ( diluição 1:50).

Opcionalmente pode pesar-se 80 - 130 mg de amostra fecal e para garantir uma proporção de diluição constante (1:50) aplicar o volume de tampão de extração adequado em função do peso da amostra fecal em questão (ver tab. 1).

Tab.1: Volume do tampão de extração diluído que é necessário em função do peso da amostra fecal

| Peso [ mg ] | Volume [ ml ] |
|---|---|
| 80 | 4,00 |
| 85 | 4,25 |
| 90 | 4,50 |
| 95 | 4,75 |
| 100 | 5,00 |
| 105 | 5,25 |
| 110 | 5,50 |
| 115 | 5,75 |
| 120 | 6,00 |
| 125 | 6,25 |
| 130 | 6,50 |

No caso de resuspensão em um volume de tampão de extração constante de 5 ml, há que considerar o respectivo fator de diluição quando da avaliação (ver tab. 2).

Tab.2: Fator de diluição quando de adição constante de tampão de extração diluído (5 ml) em função do respectivo peso da amostra

| Peso de amostra [ mg ] | Fator de diluição [ml] |
|---|---|
| 80 | 62,50 |
| 85 | 58,82 |
| 90 | 55,55 |
| 95 | 52,63 |
| 100 | 50,00 |
| 105 | 47,62 |
| 110 | 45,45 |
| 115 | 43,45 |
| 120 | 41,66 |
| 125 | 40,05 |
| 130 | 38,46 |

Independentemente do método de pesagem, a homogeneização da suspensão das fezes é efetuada mediante mistura minuciosa em um misturador Vortex. Quando de fezes líquidas, são aspirados exatamente 100 µl das mesmas com uma pipeta e pipetados em exatamente 5 ml de tampão de extração diluído.

Depois da adição do tampão de extração, as amostras devem ser incubadas 5 min em RT e em seguida misturadas de novo no vortex minuciosamente. De seguida, este homogeneizado tem de ser centrifugado durante 10 minutos a pelo menos 3000 g para sedimentação das

partículas fecais maiores. O sobrenadante do extrato tem de ser diluído novamente para aplicação imediata no teste.

a. Diluição manual da amostra

Diluir novamente 20 µl do sobrenadante clarificado em 980 µl de tampão de diluição de amostras RIDASCREEN® Diluent | 3 (1:50). Depois utilizar 100 µl da amostra fecal finalmente diluída para o teste.

Em vez do método de preparação e de homogeneização do material da amostra anteriormente descrito, pode-se utilizar o tubo para fezes RIDASCREEN® Stuhlröhrchen (art. nº. GZ3006, ver 9.4.2.).

b. Diluição da amostra em sistema automático

Se o teste for realizado com o sistema DSX-ELISA da marca Dynex, o respectivo protocolo de medição necessário pode ser obtido na R-Biopharm AG e aplicado no aparelho. Este sistema executa a diluição da amostra automaticamente como se descreve abaixo.

20 µl do sobrenadante clarificado são pipetados pelo sistema automático ELISA em uma placa Deepwell e diluídos com 980 µl de tampão de extração diluído (1:50). Seguem-se dois ciclos de mistura.
Depois coloca-se no suporte da microplaca Plate RIDASCREEN® Calprotectin a quantidade de tiras de microtitulação que são necessárias. Aliquotas de 100 µl de amostra diluída são transferidas da placa Deepwell para a microplaca Plate RIDASCREEN® Calprotectin (diluição final 1:2500).

Para realização do teste com outros sistemas automáticos de pipetagem ELISA, contate a R-Biopharm AG para obter instruções.

9.4.2. Preparação e suspensão da amostra com tubo de fezes RIDASCREEN® Stuhlröhrchen (art. nº. GZ3006)

Uma opção rápida e limpa à preparação e suspensão mediante pesagem da amostra descrita no ponto 9.4.1., é a aplicação do tubo de fezes RIDASCREEN® Stuhlröhrchen (art. nº. GZ3006). Este tubo pode ser adquirido como acessório do teste RIDASCREEN® Calprotectin e simplica significativamente a preparação da amostra.

O tubo de fezes RIDASCREEN® Stuhlröhrchen contém já 2,5 ml de tampão de extração pronto para uso e acomoda uma amostra fecal de 10 mg. No caso de amostras fecais líquidas, pode-se medir 10 µl com a pipeta e pipetá-los diretamente no tampão de extração.

O modo de coleta e extração da amostra está descrito detalhadamente e ilustrado no manual de instruções de uso que acompanha o tubo de fezes RIDASCREEN® Stuhlröhrchen e, opcionalmente, também pode ser baixado em www.r-biopharm.de .

Os extratos fecais não devem ser armazenados e devem ser utilizados para o teste logo após sua diluição.

a. Diluição manual da amostra

100 µl da suspensão fecal obtida com o tubo de fezes RIDASCREEN® Stuhlröhrchen (art. nº. GZ3006) são novamente diluídos - como se descreve no manual de instruções de uso do produto GZ3006, ponto 8 - em 900 µl de tampão de diluição RIDASCREEN® Diluent|3. 100 µl desta diluição final da amostra fecal são utilizados diretamente no teste.

b. Diluição da amostra em sistema automático

Se o teste for realizado com o sistema DSX-ELISA da marca Dynex, o respectivo protocolo de medição necessário pode ser obtido na R-Biopharm AG e aplicado no aparelho.

Depois coloca-se no suporte da microplaca Plate RIDASCREEN® Calprotectin a quantidade de tiras de microtitulação que são necessárias. A suspensão fecal extraída com o tubo de fezes é diluída automaticamente 1:10 na microplaca Plate pelo sistema automático ELISA (diluição final 1:2500). Para isso, 10 µl da suspensão fecal são pipetados do tubo de fezes RIDASCREEN® Stuhlröhrchen (art. nº. GZ3006) diretamente para a microplaca de calprotectina e diluídos com 90 µl de tampão de diluição Diluent | 3 .

Para realização do teste com outros sistemas automáticos de pipetagem ELISA, contate a R-Biopharm AG para obter instruções.

9.5. Primeira incubação

Depois de se encaixar uma quantidade de tiras/poços sufucientes no suporte, adiciona-se aos respectivos poços 100 µl de calibrador Calibrator (recomendado em duplicado, no caso de aplicação da calibração de um ponto) **ou** 100 µl de cada um dos padrões 1 a 5 Standard 1 – Standard 5 (recomendado em duplicado, no caso de aplicação da curva padrão), 100 µl cada de tampão de diluição de amostras RIDASCREEN® Diluent | 3 (=controle negativo) e de controle positivo Control | + bem como da amostra fecal diluída a analisar. Utilizando-se o controle "Low-Positiv", adiciona-se também 100 µl de Low control | +. Em seguida, incubar a placa uma hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.6. Primeira lavagem

A lavagem cuidadosa é importante para conseguir resultados corretos pelo que deve ser realizada seguindo-se as instruções rigorosamente. A solução da incubação que se encontra

nos poços deve ser esvaziada primeiro para um recipiente de lixo contendo solução de hipoclorito para desinfecção. Depois disso, bate-se na placa sobre papel absorvente para remover o resto da umidade. Em seguida, lava-se a placa 5 vezes com 300 µl de tampão de lavagem de cada vez (ver ponto 9.2.). Assegurar que ela é esvaziada completamente batendo-lhe depois de cada uma das lavagens sobre uma parte do papel ainda seca e por usar.

**Utilizando-se uma lavadora de microplacas deve-se verificar se ela está corretamente programada para o tipo de microplaca em questão. Além disso, as suspensões de fezes que não estiverem completamente livres de partículas devem ser removidas dos poços manualmente antes da primeira lavagem para evitar o entupimento das agulhas de lavagem.**

**Durante os passos de lavagem, é importante assegurar que o líquido é aspirado completamente. Depois da lavagem final, deve bater-se na placa cuidadosamente sobre papel ou toalhas de laboratório para remover restos de umidade.**

9.7. Segunda incubação

Adicionar 100 µl de conjugado Conjugate em todos os poços. Em seguida, incubar a placa uma hora a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

9.8. Segunda lavagem

Depois do período de incubação ter decorrido, o conjugado que se encontra nos poços deve ser esvaziado para um recipiente de lixo com solução de hipoclorito para desinfecção. Depois disso, bate-se na placa sobre papel absorvente para remover o resto da umidade. Em seguida, lava-se a placa 5 vezes com 300 µl de tampão de lavagem de cada vez. Assegurar que ela é esvaziada completamente batendo-lhe depois de cada uma das lavagens sobre uma parte do papel ainda seca e por usar.

9.9. Terceira incubação

Adicionar 100 µl de substrato SeroSC em todos os poços. Em seguida, incubar a placa 15 minutos ao escuro a temperatura ambiente (20 - 25 °C). Depois disto, adicionar 50 µl de reagente de parada Stop em todos os poços para terminar a reação.

Depois de misturá-lo cuisadosamente (batendo-se suavemente na beira da placa), medir a extinção a 450 nm e um comprimento de onda de referência de 620 nm.

Nota: Amostras de pacientes fortemente positivas podem causar precipitados de substrato pretos. As amostras devem ser diluídas na proporção 1:10 e novamente analisadas (ver ponto 9.5.) (diluição final da amostra de fezes: 1:25000).

## 10. Controle de qualidade - Sinais de caducidade do reagente

Para fins de controle da qualidade, devem ser utilizados em cada realização do teste o calibrador Calibrator (recomendado em duplicado, no caso de aplicação da calibração de um ponto) **ou** os padrões 1 a 5 Standard 1 – Standard 5 (recomendado em duplicado, no caso de aplicação da curva padrão), o tampão de diluição de amostras RIDASCREEN® Diluent | 3 como controle negativo e o controle positivo Control | + para garantir a estabilidade dos reagentes e a realização correta do teste. A aplicação do controle "Low-Positiv" é opcional.

O teste foi realizado corretamente quando o valor de extinção (OD) do controle negativo a 450 nm / 620 nm for menor do que 0,05 e o mediano do valor de extinção (OD) do calibrador (no caso de avaliação de 1 ponto) estiver dentro da gama mencionada na folha de dados específica do lote. O controle positivo é decisivo para a validação do teste tanto quando da utilização do calibrador como dos cinco padrões e tem de estar dentro da gama de concentração específica do lote mencionada na folha de dados.

Ao realizar o teste RIDASCREEN® Calprotectin em sistemas automáticos ELISA abertos, o valor de extinção (OD) do calibrador Calibrator pode divergir da gama mencionada no certificado específico do lote em função do aparelho utilizado (quando da avaliação da calibração de 1 ponto). Também nos sistemas automáticos ELISA, o controle positivo Control | + é decisivo para a validação dos resultados do teste e deve ser sempre aplicado. A aplicação do controle "Low-Positiv" Low control | + não é mandatória.

Se os valores divergirem dos requeridos ou se os reagentes estiverem turvos ou o substrato incolor estiver azulado antes de serem adicionados nos poços, pode ser sinal de que os reagentes já caducaram. Se os valores estipulados não forem atingidos, há que verificar os pontos seguintes antes da repetição do teste:

- Data de validade dos reagentes utilizados
- Funcionalidade do equipamento utilizado (calibração, por exemplo)
- Realização correta do teste
- Controle visual dos componentes do kit quanto a contaminação ou má vedação; uma solução de substrato com coloração azulada já não deve ser utilizada.

Se as condições após repetição do teste ainda não forem satisfatórias, contate o fabricante ou o seu distribuidor R-Biopharm local.

## 11. Avaliação e interpretação

A concentração de calprotectina em mg/kg nas fezes é determinada com o teste RIDASCREEN® Calprotectin ELISA mediante a calibração de 1 ponto (ver 11.1.), mediante o modelo logistic-log de 4 parâmetros (4PL) ou mediante a curva padrão (ver 11.2.).

Para apuramento dos resultados, é necessário o software de avaliação RIDA®SOFT Win.net Este software RIDA®SOFT Win.net ou sua atualização pode ser obtido na R-Biopharm AG ou através do distribuidor R-Biopharm local.

Em vez do software RIDA®SOFT Win.net também é possível utilizar outro software de avaliação que disponibilize o modelo logistic-log de 4 parâmetros.

### 11.1. Calibração de um ponto com quantificação pelo modelo logistic-log de 4 parâmetros

Os parâmetros (A - D) da curva padrão bem como os valores teóricos para o calibrador, controle positivo e controle "Low-Positiv" que são necessários para o cálculo 4PL estão indicados na folha de dados específica do lote que acompanha o kit e têm de ser comparados com os respectivos valores no software de avaliação antes de cada medição.

No controle final de qualidade, a R-Biopharm AG apura para cada lote de kits em condições de teste ideais a curva padrão (inclusive os parâmetros A - D) bem como um valor teórico e uma gama OD permitida para o calibrador e uma gama de concentração permitida para o controle positivo e controle "Low-Positiv". O calibrador é aplicado para compensar flutuações do teste e para verificar a qualidade do processo. O controle positivo é decisivo para a validação do teste.

Do valor médio da determinação dupla do calibrador e seu valor teórico, o software RIDA®SOFT Win.net calcula internamente um fator de correção F e compensa-o com as extinções das amostras fecais. A avaliação segura e fiável dos resultados do teste é possível dentro dos limites da curva padrão.

### 11.2. Quantificação mediante a curva padrão

A avaliação do teste RIDASCREEN® Calprotectin pode ser efetuada mediante uma curva padrão que tem de ser processada em cada ciclo. A progressão exemplificativa de uma curva padrão está representada na folha de dados específica do lote incluída no teste.

No controle final de qualidade, a R-Biopharm AG apura para cada lote de kits em condições de teste ideais um valor teórico e uma gama de concentração para o controle positivo e para o controle "Low-Positiv". Na quantificação mediante a curva padrão, o controle positivo é decisivo para a validação do teste. A gama de concentração prescrita para o controle positivo tem de ser atingida.

### 11.3. Resultado do teste

A partir de um valor "cut-off" > 50 mg/kg de calprotectina humana nas fezes, o resultado deverá ser considerado positivo. Se os resultados estiverem abaixo do valor "cut-off", as amostras devem ser consideradas negativas.
O valor "cut-off" de 50 mg/kg sugerido para adultos, também pode ser aplicado para crianças e jovens entre os 4 e 17 anos de idade.

Recomendamos a cada laboratório que estabeleça uma gama de valores padrão própria.

**Recomendamos diluir novamente (1:5 em Diluent 3) as amostras que, na avaliação pelo procedimento de calibração de 1 ponto ou pelo procedimento de curva padrão, apresentem concentrações de calprotectina acima de 600 mg/kg e submetê-las de novo à medição no teste.**

**Além disso, recomendamos diluir também novamente (1:5 em Diluent 3) as amostras que, na avaliação pelo procedimento de calibração de 1 ponto, apresentem valores OD acima de 3,0 e submetê-las de novo à medição no teste.**

## 12. Limites do método

O teste RIDASCREEN® Calprotectin detecta epítopos de calprotectina humana em amostras fecais. Não devem ser concluídos diagnósticos só em função da determinação da concentração de calprotectina; há que considerar o histórico clínico e os sintomas do paciente.

## 13. Características de desempenho

13.1. Precisão

13.1.1. Precisão intra-teste

A precisão intra-teste foi determinada com 4 referências em 40 réplicas cada. Dos valores OD destas medições, foram apuradas as concentrações de calprotectina através do calibrador e da curva padrão e dos resultados obtidos foram calculados os valores médios (MW), os desvios padrão (SD) e os coeficientes de variação (VK) das medições para cada amostra.

Tab. 3: Precisão intra-teste do RIDASCREEN® Calprotectin

| | Calibrator | | | Curva padrão | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | MW (mg/kg) | SD (mg/kg) | **VK (%)** | MW (mg/kg) | SD (mg/kg) | **VK (%)** |
| Referência A | 53,8 | 2,9 | **5,4** | 56,6 | 3,0 | **5,3** |
| Referência B | 96,6 | 5,5 | **5,7** | 102,4 | 6,3 | **6,2** |
| Referência C | 136,5 | 5,6 | **4,1** | 130,5 | 5,2 | **4,0** |
| Referência D | 246,7 | 14,1 | **5,7** | 267,6 | 15,0 | **5,6** |

13.1.2. Precisão inter-teste

A precisão inter-teste foi determinada em duplicado por 3 técnicos com 4 referências em 20 ciclos (2 ciclos por dia) em dias diferentes. Dos valores OD destas medições foram apuradas as concentrações de calprotectina através do calibrador e da curva padrão e dos resultados obtidos foram calculados os valores médios (MW), os desvios padrão (SD) e os coeficientes de variação (VK) das medições para cada amostra.

Tab. 4: Precisão inter-teste do RIDASCREEN® Calprotectin

| | Calibrator | | | Curva padrão | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | MW (mg/kg) | SD (mg/kg) | **VK (%)** | MW (mg/kg) | SD (mg/kg) | **VK (%)** |
| Referência A | 55,7 | 4,3 | **7,7** | 57,5 | 4,1 | **7,1** |
| Referência B | 106,5 | 7,2 | **6,8** | 112,8 | 8,3 | **7,3** |
| Referência C | 129,6 | 7,8 | **6,0** | 138,5 | 7,6 | **5,5** |
| Referência D | 260,9 | 28,3 | **10,9** | 284,7 | 22,7 | **8,0** |

13.2. Precisão da extração

A precisão da extração foi determinada em duplicado por 2 técnicos com 3 amostras fecais de valores acima do "cut off" em 10 ciclos (5 dias, 2 ciclos por dia) em dias diferentes. As amostras foram extraídas antes de cada ciclo e diluídas de modo correspondente. Dos valores OD destas medições foram apuradas as concentrações de calprotectina através do calibrador e da curva padrão e dos resultados obtidos foram calculados os valores médios (MW), os desvios padrão (SD) e os coeficientes de variação (VK) das medições para cada amostra.

Tab. 5: Precisão inter-teste da extração

| | Calibrator | | | Curva padrão | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | MW (mg/kg) | SD (mg/kg) | **VK (%)** | MW (mg/kg) | SD (mg/kg) | **VK (%)** |
| Amostra A | 64,0 | 5,0 | **7,9** | 67,4 | 5,0 | **7,5** |
| Amostra B | 114,1 | 10,3 | **9,0** | 123,2 | 10,7 | **8,7** |
| Amostra C | 264,0 | 33,3 | **12,6** | 284,8 | 22,1 | **7,8** |

## 14. Literatura


Johne B et al. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. J Clin Pathol Mol Pathol 1997; 50: 113-123.

Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. Lancet 2000; 268: 353-363.

Tibble JA et al. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2000; 119: 15-22.

Tibble J et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn´s disease. Gut 2000; 47: 506-513.

Summerton CB et al. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002; 841: 841-845.

Striz I, Trebichavski I. Calprotectin – a pleiotropic molecular in acute and chronic inflammation. Physiol Res 2004; 53: 245-253.

Costa F et al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohns disease. Gut 2005; 54: 364–368.

Fagerberg UL et al. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005; 40: 450-455.

Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in IBD. Inflamm Bowel Dis 2006; 12(6): 524-534.

Schopfer AM et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the simple endoscopic score for Crohn' s disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI.
Am J Gastroenterol 2010; 105: 162–169.

Van Rheenen PF et al. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. BMJ 2010; 341:c3369.